



REC'D 26 SEP 2000

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

FR00/02088

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 IIII. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30





BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa

N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **21 JUIL 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9909461**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **21 JUIL 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2 Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

demande initiale

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

BFF 99/0343

53-20-14-20

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé et kit pour l'obtention d'une mousse adhésive fluide à usage chirurgical et/ou thérapeutique à partir d'un composé protéique en poudre.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

IMEDEX BIOMATERIAUX

Forme juridique

Nationalité (s)

Française

Pays

Adresse (s) complète (s)

Zone Industrielle Les Troques 69630 CHAPONOST

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

CABINET LAVOIX

M. BOLENSKY n° 92.118

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 09 461

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé et kit pour l'obtention d'une mousse
adhésive fluide à usage chirurgical et/ou thérapeutique à partir
d'un composé protéique en poudre.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

IMEDEX BIOMATERIAUX

Zone Industrielle Les Troques 69630 CHAPONOST FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

TAYOT Jean-Louis

1 rue des Greffières

69890 LA TOUR DE SALVAGNY FRANCE

BAYON Yves

81 rue Alexandre Boutin

96100 VILLEURBANNE FRANCE

GRAVAGNA Philippe

23 Grande Rue

69540 IRIGNY FRANCE

DUBOIS Michel Marie

34 chemin du Signal

69110 STE FOY LES LYON FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 2 Septembre 1999

CABINET LAVOIX

M. MONCHENY n° 92.1179

A. Monchény

La présente invention se situe dans le domaine des adhésifs biologiques, biodégradables et non toxiques destinés à un usage chirurgical et/ou thérapeutique.

5 D'une manière plus précise, la présente invention est relative à un procédé pour obtenir une mousse adhésive fluide biocompatible, ~~biorésorbable et non toxique à usage chirurgical et/ou thérapeutique,~~ pouvant renfermer en outre des substances bioactives libérables en un site déterminé.

Elle concerne aussi un kit pour la mise en œuvre d'un tel procédé.

10 Elle concerne encore l'utilisation de la mousse adhésive préparée par le procédé et au moyen du kit selon l'invention, en chirurgie ou à des fins thérapeutiques, notamment pour la protection de plaies et la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté.

La préparation d'éponges de fibrine ou de collagène ou de leurs
15 mélanges à partir de solutions ou de mousses est déjà connue. Ces produits sont utilisés pour leurs propriétés hémostatiques mais ont des applications limitées et n'ont pas de pouvoir adhésif en l'absence de sang. Voir, par exemple : IMMUNO BAXTER WO 99/15209.

La préparation de colles biologiques biocompatibles et
20 biodégradables à partir de protéines telles que le collagène, la gélatine, l'albumine, le fibrinogène a été décrite dans différents brevets parmi lesquels on peut citer, par exemple :

- FUSION (PCT/WO 9729715)
- IMEDEX (FR 2 715 309, FR 2 754 267, FR 2 754 268)
- 25 - MATRIX PHARMACEUTICAL (US 5290552)
- BAXTER (PCT/WO 9802098).

Généralement elle repose sur des systèmes comportant deux
~~seringues dont chacune contient respectivement la protéine destinée à~~
être polymérisée/réticulée, solubilisée en milieu aqueux et un agent de
30 polymérisation/réticulation également solubilisé en milieu aqueux. Ces systèmes sont équipés de moyens de connexion pour obtenir un mélange

homogène liquide qui est ensuite appliqué sur les tissus, les plaies chirurgicales ou cutanées.

Un problème majeur rencontré pour fabriquer ces produits liquides injectables est la difficulté de préparation de ces seringues dans des conditions de stérilité absolue. En effet, ces produits aqueux ne peuvent pas être stérilisés, en fin de préparation, par les procédés classiques et fiables tels que la chaleur sèche, la chaleur humide, ou l'irradiation par rayonnement gamma ou beta (faisceau d'électrons accélérés), qui dénaturent les composants biologiques utilisés.

On est ainsi appelé à réaliser des étapes de filtration, de lyophilisation et de répartition qui doivent être effectuées dans des enceintes protégées et coûteuses, nécessitant beaucoup de préparatifs et une main d'œuvre nombreuse et très qualifiée.

Les procédures de validation auprès des autorités de contrôle de ces étapes critiques sont également très compliquées.

Les prix de revient de fabrication de ces produits étant très élevés, cela freine leur développement, en particulier auprès des services hospitaliers, soumis eux-mêmes à des contraintes budgétaires de plus en plus draconiennes.

Un autre problème important est la difficulté de stockage et de distribution de ces produits biologiques adhésifs, qui doivent être généralement conservés à +4°C sur de longues périodes, ce qui entraîne des frais supplémentaires chez le distributeur ou à l'hôpital où les capacités de stockage à basse température sont plus limitées qu'à température ambiante.

Ces deux inconvénients majeurs gênent le développement commercial de ces produits qui, par ailleurs, ont un potentiel important grâce aux nombreuses applications médicales décrites dans les demandes de brevets précitées.

L'objectif de la présente invention est donc de trouver une solution pratique à ces méthodes de préparation des colles biologiques, en particulier pour en diminuer le prix de revient industriel.

L'objectif de la présente invention est de fournir un procédé de préparation d'une mousse adhésive fluide adaptée à un usage chirurgical et/ou thérapeutique, qui permette de remédier aux inconvénients précités, en particulier qui soit simple et de coût réduit.

5 Elle a aussi pour objectif un tel procédé permettant de fournir les éléments de préparation d'une mousse adhésive fluide prête à l'emploi.

pouvant être stockés dans des conditions simples, en particulier à température ambiante.

10 Elle a encore pour objectif de fournir un tel procédé permettant en outre une stérilisation simple et efficace du produit prêt à l'emploi, satisfaisant la réglementation.

L'invention a aussi pour objectif de fournir un kit pour la mise en œuvre du procédé précité, permettant de préparer extemporanément, de façon simple rapide et peu coûteuse, dans des conditions stériles, la
15 mousse adhésive précitée.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé pour la préparation d'une mousse adhésive fluide biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou thérapeutique, notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté ou
20 pour la protection de plaies, caractérisé en ce qu'il comprend le fait de mélanger extemporanément, de manière homogène, un gaz ou un mélange de gaz biocompatibles et non toxiques avec un matériau de matrice adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique obtenu par mélange d'un composé protéique potentiellement adhésif, sous forme
25 pulvérulente, déshydratée et stérilisée, avec une solution aqueuse stérile.

Dans un mode de mise en œuvre très intéressant de l'invention, le composé protéique peut être polymérisable et/ou réticulable (on utilisera ci-après l'expression « polymérisable/réticulable »), et l'on préfère alors
amener dans la matrice adhésive un agent de polymérisation/réticulation.

30 Cet agent peut être par exemple contenu dans la solution aqueuse. Il peut, en variante, être mélangé, sous forme solide et pulvérulente, au composé protéique potentiellement adhésif sous forme pulvérulente.

Il peut aussi, en variante, être amené séparément dans le mélange.

Dans un tel mode de réalisation utilisant un composé protéique polymérisable/réticulable, on comprend que l'on peut obtenir, in situ, lors de l'application de la mousse adhésive ou après son application, un durcissement de la mousse résultant de la polymérisation ou de la réticulation. Le matériau de mousse polymérisé/réticulé peut, selon le choix des composants, rester adhésif ou même perdre ses propriétés adhésives, par exemple lorsque l'on vise une application chirurgicale dans laquelle on souhaite une disparition rapide de l'adhésif protéique par dilution ou dispersion progressive. Il est cependant essentiel, dans le cadre de l'invention, que la mousse se trouve, au moment de son application chirurgicale ou thérapeutique, dans un état dans lequel elle est adhésive.

L'invention a aussi pour objet un kit pour la préparation d'une mousse adhésive fluide biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou thérapeutique, notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux ou à un biomatériau implanté ou pour la protection de plaies.

Les inventeurs ont mis en évidence, de manière tout à fait surprenante, la possibilité d'obtenir une mousse adhésive biocompatible, biorésorbable et non toxique, fluide et injectable, adaptée à un usage chirurgical et/ou thérapeutique, à partir d'un composé protéique sous forme pulvérulente, notamment lyophilisé, ou séché par un solvant volatil.

Ils ont également montré que les composants, notamment le composé protéique, pour la formation de la mousse pouvaient être stérilisés par les méthodes classiques et fiables, notamment par irradiations gamma ou bêta.

Ils ont aussi mis en évidence que l'on pouvait éviter le stockage à basse température du kit pour la préparation de la mousse.

En effet, les inventeurs ont testé la possibilité d'obtenir une mousse adhésive à partir de collagène en poudre déshydratée et d'un agent de

polymérisation/réticulation solubilisé en milieu aqueux, chacun réparti dans une seringue.

Ils ont essayé de faire varier la température et le volume de la solution aqueuse, contenant ou pas l'agent de réticulation, pour tester la
5 possibilité d'obtenir rapidement et sans efforts un mélange fluide
-- homogène en introduisant le contenu de la seringue de solution aqueuse,

dans la seringue de collagène en poudre et en effectuant plusieurs va-et-
vient, pour essayer d'obtenir simplement un mélange homogène. Ces
essais ont été négatifs quels que soient le volume de solution aqueuse et
10 la température de 20 à 60°C.

Il se forme instantanément un bouchon de gros agrégats protéiques
réhydratés partiellement en surface, qui ne peuvent pas s'écouler dans le
canal de communication entre les deux seringues et qui empêchent de
réaliser les va-et-vient nécessaires à une bonne homogénéisation du
15 produit.

Ils ont ensuite vérifié si les mêmes difficultés se produisaient avec
la même préparation de collagène en poudre sèche, après avoir été
soumise à une opération de stérilisation par rayonnement gamma
(irradiation par le cobalt radioactif).

20 Les caractéristiques physiques du collagène irradié en poudre
sèche sont différentes de celles du collagène non irradié, notamment du
point de vue du profil électrophorétique en gel de polyacrylamide et des
propriétés de solubilité. Le collagène initial en particulier est entièrement
soluble dans l'acide chlorhydrique HCl 0,01 N, alors que sa solubilité est
25 diminuée après irradiation à cause d'une réticulation partielle de certaines
chaînes protéiques.

De manière inattendue et totalement imprévisible, la poudre de
collagène stérilisée en seringue par l'irradiation gamma à une dose de 5 à
30 kilograys a pu être facilement mélangée avec la solution aqueuse dans
les diverses conditions précédemment testées sans succès avec la
poudre de collagène non stérilisée.

Il en découle l'invention totalement imprévisible que des mousses fluides adhésives non toxiques, biocompatibles et biodégradables telles que précitées, peuvent être très facilement fabriquées par le procédé tel que défini ci-dessus.

5 Le procédé et le kit selon l'invention vont être décrits plus en détails ci-après.

Selon l'invention, par « matrice adhésive », on entend un réseau constituant ou comprenant un composé protéique, au moins partiellement polymérisé/réticulé qui est non toxique, biocompatible et biodégradable et
10 qui possède des propriétés adhésives, ledit réseau renfermant un gaz ou un mélange de gaz biocompatibles et non toxiques.

Les propriétés adhésives de la matrice sont généralement acquises par un processus de polymérisation et/ou de réticulation d'un composé protéique, initié par un ou plusieurs agent(s) de polymérisation/réticulation
15 fourni(s) avant la formation de la mousse. Cet agent peut également être constitué par une irradiation stérilisante.

Par « non toxique », on entend tout produit dont la toxicité est suffisamment faible pour permettre une utilisation en chirurgie et/ou en thérapeutique du corps humain ou animal, quel que soit le site
20 d'application, en satisfaisant aux critères et normes imposés par la législation.

Par « biodégradable », on entend tout composant susceptible de disparaître par dégradation progressive (métabolisation).

De ce fait, la matrice adhésive peut correspondre, du point de vue
25 de sa composition chimique, aux adhésifs et colles biologiques connus.

Le terme « composé protéique » désigne une protéine ou un mélange de protéines, éventuellement chimiquement modifiées, notamment par méthylation ou succinylation, ou encore dont la structure
de base a été altérée pour créer ou greffer des fonctions réactives,
30 notamment par coupure oxydative ou acylation ou sulfonation.

L'invention s'étend ainsi aux matrices adhésives obtenues à partir d'un matériau formé par mélange d'un composé protéique potentiellement

adhésif sous forme pulvérulente, stérile et d'un agent de polymérisation/réticulation.

Conformément à l'invention, par « composé protéique potentiellement adhésif », on entend tout composé protéique tel que défini
5 précédemment capable de développer des propriétés adhésives lors de son mélange avec une solution aqueuse convenable.

Ces propriétés adhésives peuvent résulter du simple mélange du composé protéique potentiellement adhésif et de la solution aqueuse stérile appropriée. Ceci est par exemple le cas de certaines préparations
10 de collagène lorsqu'on les met au contact d'une solution aqueuse, par exemple de l'eau ou un sérum physiologique.

Ces propriétés adhésives peuvent, au contraire, résulter de la mise en contact du composé protéique avec un composé initiateur d'adhésion.

Elles peuvent résulter, notamment, de la mise en contact d'un
15 composé protéique polymérisable/réticulable avec un agent de polymérisation/réticulation.

Le composé protéique est mis en œuvre sous forme de poudre, stérilisée.

Les protéines mises en œuvre aux fins de l'invention sont choisies
20 de préférence parmi le collagène, la gélatine, l'albumine, l'élastine et le fibrinogène, et plus préférentiellement parmi le collagène et l'albumine. Le collagène est tout particulièrement préféré.

Le collagène utilisé aux fins de l'invention peut être indifféremment d'origine humaine ou animale, ou obtenu par des moyens de
25 recombinaison génétique. Il peut s'agir de collagène de type I, III, IV ou V, ou encore de leur mélange en toute proportion.

Il peut s'agir de collagène natif, c'est-à-dire qui a conservé sa structure hélicoïdale d'origine, éventuellement chimiquement modifié par
méthylation, par succinylation ou toute autre méthode connue, notamment
30 pour le rendre plus soluble à pH physiologique, ou encore traité pour éliminer les télépeptides, notamment par digestion à la pepsine.

On peut utiliser également du collagène constitué majoritairement de chaînes α dont le poids moléculaire est voisin de 100 kDa, non hydrolysé. Dans ce cas, la structure hélicoïdale du collagène est dénaturée, au moins partiellement, par exemple par un chauffage modéré, notamment à une température comprise entre 40 et 70°C, dans des conditions douces de manière à éviter la dégradation par coupure hydrolytique de la gélatine ainsi formée, généralement moins de 10% des chaînes collagéniques ayant un poids moléculaire inférieur à 100 kDa.

Une telle gélatine est appelée ci-après « collagène chauffé », pour la distinguer de la gélatine du commerce qui peut également être utilisée aux fins de l'invention mais de manière non préférée.

Le collagène natif ou le collagène chauffé décrit précédemment est mis en œuvre sous forme pulvérulente, de préférence après déshydratation à l'acétone ou lyophilisation.

Il est stérilisé par les méthodes classiques, avant la formation du matériau de matrice adhésive, par exemple par irradiation gamma ou beta ou de manière moins préférée par chauffage dans un four à air chaud, à une température et pendant un temps suffisants pour satisfaire aux exigences de stérilité.

Selon l'invention, l'agent de polymérisation/réticulation peut comprendre un composé ou un mélange de composés compatible avec le composé protéique polymérisable/réticulable pour provoquer la polymérisation/réticulation de celui-ci par un mélange extemporané, ou lorsqu'ils sont déjà en pré-mélange, à l'aide d'un initiateur, généralement en quelques minutes.

Selon l'invention l'agent de polymérisation/réticulation peut être mis en œuvre sous forme solubilisée en milieu aqueux ou sous forme pulvérulente, de préférence lyophilisée.

Conformément à la présente invention, l'agent de réticulation peut être choisi parmi des polymères réactifs naturels ou synthétiques, de préférence de poids moléculaire supérieur à 1000, tels que des polyaldéhydes macromoléculaires, des polymères hydrophiles, dont la

diffusion ultérieure à partir de la colle est gênée par le poids moléculaire important, empêchant une toxicité directe immédiate.

Par « polymères réactifs », on entend des polymères capables de réagir avec les composés protéiques tels que définis précédemment, en particulier vis-à-vis de fonctions amine ou sulfhydryle qu'ils peuvent
5 contenir

Les polyaldéhydes macromoléculaires qui peuvent être mis en œuvre selon l'invention comprennent des polyaldéhydes biodégradables d'origine naturelle, c'est-à-dire tout composé présentant plusieurs
10 fonctions aldéhydiques dérivées d'un polymère naturel biodégradable.

Les polyaldéhydes peuvent être utilisés seuls ou en mélange, le terme « polyaldéhyde » utilisé ici désignant indifféremment un composé seul ou un mélange de plusieurs de ces composés.

Ces polyaldéhydes macromoléculaires peuvent être préparés par oxydation de polysaccharides ou de mucopolysaccharides notamment
15 avec de l'acide périodique ou l'un de ses sels selon un procédé connu en soi.

Parmi les polysaccharides ou mucopolysaccharides convenant à la réalisation de l'invention, on peut citer l'amidon, le dextrane, l'agarose, la
20 cellulose, la chitine, le chitosane, l'acide alginique, les glycosaminoglycanes, l'acide hyaluronique, et la chondroïtine sulfate ou leurs dérivés. L'amidon et le dextrane sont préférés, l'amidon étant tout particulièrement préféré.

Le polyaldéhyde peut être obtenu en ajoutant à la solution de polysaccharide ou mucopolysaccharide, une solution d'acide périodique
25 ou l'un de ses sels jusqu'à l'obtention d'une concentration finale comprise entre 0,01 et 1 M, de préférence entre 0,25 et 0,5 M. L'étape d'oxydation peut être opérée sur des solutions, des gels ou des suspensions de polysaccharide(s).

30 La préparation de polysaccharide oxydé peut ensuite être soumise à des dialyses, diafiltrations, filtrations, ultrafiltrations, dans le but

d'éliminer les produits de la réaction d'oxydation et des réactifs ainsi que des dérivés iodés formés pendant la réaction, ou en excès.

Avant utilisation, le polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé est conservé de préférence en solution acide, au pH qu'il acquiert spontanément, à une concentration comprise entre 0,5 et 5% en poids, de préférence entre 1 et 3%.

La solution est stable à l'abri de l'air et est conservée de préférence entre +1°C et +25°C.

Dans une variante, le polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé peut être sous forme lyophilisée acide ou neutre. On peut l'utiliser ainsi ou redissoudre le lyophilisat dans l'eau ou avec le tampon physiologique nécessaire.

Les polymères hydrophiles utiles aux fins de l'invention présentent de préférence un poids moléculaire de 1000 à 15000 Da, de préférence entre 2000 et 5000. Ils comprennent, par exemple, les dérivés de poly(éthylène) glycol (PEG), les poly(oxyéthylène), les poly(méthylène glycol), les poly(triméthylène glycol), les poly(vinylpyrrolidone), les dérivés du PEG étant les plus préférés. Ils peuvent être linéaires ou ramifiés, mais ne sont pas fortement réticulés. Les polymères en bloc poly(oxyéthylène)-poly(oxypropylène) ayant éventuellement un noyau éthylène diamine (polymère à 4 fins de chaînes) peuvent également convenir.

Les polymères hydrophiles sont « activés » pour réagir sélectivement avec les amines et les thiols des protéines. En fin de chaînes des polymères, on trouve une structure semblable à : chaîne du polymère-liant-GP (Groupe partant) pour les polymères réagissant avec les amines ou -chaînes du polymère-GRT (Groupe réactif vis-à-vis des thiols) pour les polymères réagissant avec les thiols.

Le liant peut être sélectionné parmi des groupes consistant en un carbonate $-C(O)-$, en un monoester $-R-CH_2-C(O)-$ ou un diester $-C(O)-O-(CH_2)_n-O-C(O)-$, le GP peut être un dérivé succinimidyle, maléimidyle, phtalimidyle, imidazolyle, nitrophényle, trésyle ..., le dérivé succinimidyle étant le plus préféré. Enfin, les GTR peuvent être choisis

parmi les dérivés vinylsulfone, iodoacétamide, maléimide et orthopyridyle-disulfure.

Ces polymères hydrophiles sont synthétisés suivant des méthodes connues de l'Homme de l'art.

5 Ils peuvent être conservés sous forme déshydratée, conditionnés en seringues.

10 Pour l'obtention de la matrice adhésive, les composés protéiques précités sous forme de poudre, notamment le collagène, le collagène chauffé ou l'albumine, sont mélangés extemporanément à l'agent de polymérisation/réticulation solubilisé en milieu aqueux, dans des conditions telles que la polymérisation/réticulation desdits composés protéiques puisse se faire en un temps de préférence inférieur à 5 minutes.

15 Ce temps de polymérisation/réticulation peut être contrôlé selon les constituants mis en œuvre pour l'obtention de la matrice adhésive, d'une manière connue en soi.

20 La solution aqueuse stérile contenant l'agent de réticulation est préparée soit directement par le fabricant, soit par l'utilisateur final à partir d'eau distillée ou autre véhicule aqueux et de l'agent de réticulation sous forme sèche, contenus dans deux flacons stériles séparés.

25 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la matrice adhésive est obtenue à partir du mélange d'un composé protéique en poudre sèche stérilisée, de préférence du collagène natif, du collagène chauffé ou de l'albumine, avec un polysaccharide ou mucopolysaccharide oxydé, de préférence l'amidon ou le dextrane oxydé, solubilisé en milieu aqueux et stérilisé.

30 La matrice adhésive peut ainsi être préparée, selon un premier mode de réalisation de l'invention, à partir d'un mélange de polysaccharide oxydé et de collagène, dans un rapport en poids de 1 : 10 à 1 : 160, de préférence de 1 : 15 à 1 : 50, avec une concentration finale en collagène de 2 à 16%, de préférence de 2 à 13% en poids. La température de la solution de polysaccharide oxydé est de préférence

comprise entre +20°C et +60°C, de préférence entre 40 et +50°C. La température du matériau de matrice adhésive obtenu est comprise de préférence entre +30°C et +41°C. Le temps de réaction du mélange peut être ajusté en fonction du pH du collagène, variant entre 6,5 et 7,5. Un
5 temps rapide de polymérisation, inférieur à 1 minute, peut être obtenu à pH 7,5 et être progressivement diminué en acidifiant la solution permettant la préparation de la poudre de collagène jusqu'à pH 6,5.

Dans un autre mode de réalisation, la matrice adhésive peut être préparée, à partir d'un mélange de polysaccharide oxydé et de collagène
10 chauffé, dans un rapport en poids de 1 :10 à 1 :160, de préférence de 1 :15 à 1 :50, avec une concentration finale en collagène chauffé de 6 à 20 %, de préférence de 8 à 15 % en poids. La température de la solution de polysaccharide oxydé est de préférence comprise entre +40 et +60°C, de préférence entre +45 et +50°C. La température du matériau de matrice
15 adhésive obtenu est comprise de préférence entre +30°C et +41°C. Le temps de réaction du mélange peut être ajusté en fonction du pH du collagène, variant entre 6,5 et 7,5. Un temps rapide de polymérisation, inférieur à 1 minute, peut être obtenu à pH 7,5 et être progressivement diminué en acidifiant la solution permettant la préparation de la poudre de
20 collagène jusqu'à pH 6,5.

Selon une autre variante préférée de l'invention, la matrice adhésive est obtenue à partir d'un mélange de composé protéique sous forme sèche et d'agent de polymérisation/réticulation sous forme sèche également.

25 D'une manière générale, pour le mélange des deux poudres, on préfère lyophiliser l'agent de réticulation dans l'une des seringues utilisées pour la formation de la mousse, puis ajouter au lyophilisat le composé protéique sous forme sèche. Sa déshydratation est obtenue par tout procédé connu de l'Homme de l'art.

30 L'état déshydraté des deux constituants les empêche de réagir l'un sur l'autre dans des conditions normales de stockage à l'abri de l'humidité et à température ambiante.

Le mélange des deux poudres peut être stérilisé par les méthodes classiques, de préférence par irradiation gamma à une dose comprise entre 5 et 30 kGray.

Dans ce cas, la matrice adhésive est obtenue par solubilisation
5 extemporanée des deux poudres stérilisées.

~~La solution aqueuse nécessaire peut consister tout simplement en~~
de l'eau qui joue le rôle d'initiateur de la polymérisation/réticulation conduisant à la matrice adhésive.

10 Selon le composé protéique mis en œuvre, en particulier dans le cas du collagène, l'eau doit être chauffée à une température de 20 à 60°C, de préférence 45 à 50°C, préalablement au mélange avec les deux poudres.

Les proportions des composés mis en œuvre peuvent être telles que définies ci-dessus.

15 Les préférences précédemment indiquées s'appliquent également dans ce cas.

Cette variante est particulièrement intéressante du point de vue de la stabilité du produit au stockage et du coût de fabrication. Elle est également très simple de mise en œuvre.

20 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la matrice adhésive est préparée à partir d'un mélange de polymère hydrophile activé en poudre et de collagène en poudre stérilisée, dans un rapport en poids de 1:50 à 1:1, de préférence entre 1:20 à 1:1, avec une concentration finale de collagène de 4 à 20 %, de préférence entre 10 et
25 18 %. La température de la solution aqueuse de reprise est comprise entre +37 et +50°C et le pH de la solution aqueuse de reprise peut varier de 6,9 à 9,0, suivant le temps de réticulation souhaité, de moins d'une minute à plusieurs dizaines de minutes. La température du mélange adhésif résultant est comprise de préférence entre +35 et +41°C.

30 Selon encore un autre mode de réalisation, on peut utiliser un mélange en poudre sèche de polysaccharide oxydé et d'albumine dans un rapport en poids de 1:4.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la matrice adhésive peut être préparée à partir de protéines ayant subi une coupure oxydative.

Dans ce cas, on peut mettre en œuvre un traitement par l'acide périodique ou l'un de ses sels, de préférence le périodate de sodium,
5 selon un procédé connu en soi.

Le collagène est particulièrement préféré aux fins de l'invention et peut être de tout type indiqué précédemment. Les préférences indiquées ci-dessus s'appliquent également dans ce cas.

10 La modification par coupure oxydative du collagène est décrite dans le brevet US 4 931 546.

On rappelle que selon ce procédé, le collagène en solution acide est mélangé à une solution d'acide périodique ou l'un de ses sels jusqu'à obtenir une concentration finale comprise entre 10^{-5} et 1M, de préférence
15 entre 0,005 et 0,1 M, à une température voisine de la température ambiante, soit entre 15 et 25°C, pendant une durée pouvant aller de 10 minutes à 72 heures.

Selon l'invention, on utilise une solution aqueuse acide de collagène dont la concentration est comprise entre 5 et 50 g/l, celle-ci
20 étant de préférence de 30 g/l.

Ce traitement provoque des coupures dans certains constituants du collagène, l'hydroxyproline et les sucres et crée ainsi des sites réactifs (groupes aldéhydes) sans en provoquer la réticulation tant que le pH de la solution de collagène reste acide.

25 Le collagène oxydé peut être conservé sous forme lyophilisée, à une température de +4°C à +25°C.

Selon ce mode de réalisation, l'agent de polymérisation/réticulation est alors formé d'un tampon à pH légèrement alcalin pour permettre la
~~est alors formé d'un tampon à pH légèrement alcalin pour permettre la~~
réticulation du mélange, à pH neutre.

30 Les tampons phosphates et carbonates sont préférés et plus particulièrement les tampons phosphates ou carbonates de sodium, leur pH étant ajusté de préférence entre 7 et 9.

On peut utiliser des tampons en solution ou sous forme déshydratée.

Selon l'invention, la matrice adhésive peut ainsi être obtenue par mélange de collagène oxydé sous forme déshydratée avec un tampon en solution, la solution pouvant elle-même résulter de la dissolution préalable d'un tampon sous forme déshydratée dans l'eau.

La concentration finale en collagène oxydé est de préférence comprise entre 1 et 8 %, la concentration finale en tampon comprise entre 5 et 50 mM et le pH final du mélange pour la matrice adhésive compris entre 6 et 8.

Les préférences indiquées précédemment pour le collagène s'appliquent également dans ce mode de réalisation.

Selon encore un autre mode de réalisation de l'invention, on peut utiliser pour la préparation de la matrice adhésive des protéines modifiées par un agent acylant ou sulfonant.

Les protéines indiquées précédemment ainsi que leurs préférences s'appliquent également à ce mode de réalisation.

L'agent de polymérisation/réticulation est également dans ce cas un tampon de pH légèrement alcalin à neutre, de préférence compris entre 6,0 et 9,0, plus préférentiellement entre 8,0 et 8,5.

La matrice adhésive est obtenue par un procédé similaire à celui indiqué précédemment en mélangeant les protéines à groupe acylant ou sulfonant avec la solution tampon pour que la réaction d'acylation ou de sulfonation puisse se produire en conduisant à la matrice adhésive.

Suivant une autre variante, on conditionne dans une seringue un mélange de protéines à groupe acylant ou sulfonant sous forme sèche au tampon de pH légèrement alcalin à neutre également sous forme sèche. ~~La matrice adhésive est obtenue extemporanément en reprenant le~~ mélange de poudre par de l'eau, à une température de 20 à 60°C, afin que la température de la mousse adhésive résultante soit comprise de préférence entre +18 et +41°C.

La concentration finale en protéine à groupe acylant ou sulfonant est de préférence comprise entre 1 et 50 %, plus préférentiellement entre 5 et 40 %, et celle du tampon est de préférence comprise entre 5 et 50 mM.

5 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la matrice adhésive peut être réalisée à partir des colles actuellement disponibles sur le marché, notamment celles vendues sous les noms « Tissucol® » ou « Tisseel® » commercialisées par Baxter, « Beriplast® » commercialisée par Centéon, après addition de collagène.

10 On prépare un mélange pulvérulent de fibrinogène (70-140 mg/ml) contenant du facteur XIII et éventuellement de la fibronectine, additionné de collagène.

L'agent de polymérisation/réticulation consiste, dans ce cas, en une solution de thrombine (4-100 U.I).

15 Conformément à l'invention, quel que soit le type de matrice adhésive choisi, la mousse adhésive est préparée lors de la formation de la matrice adhésive par mélange d'un gaz, par tout procédé connu de l'homme de l'art.

20 Le gaz peut être introduit notamment lors du mélange des constituants, c'est-à-dire lors du mélange de l'agent de polymérisation/réticulation en solution avec le composé protéique en poudre ou lors de l'introduction d'eau dans le prémélange des poudres sèches (composé protéique – agent de polymérisation/réticulation), ou directement dans le mélange préalablement formé.

25 Le gaz utilisé aux fins de l'invention peut consister en de l'air ou en l'un ou plusieurs de ses composants, par exemple azote, oxygène, gaz carbonique.

~~Les gaz préférés sont l'air, le dioxyde de carbone et l'azote.~~

30 Il peut s'agir d'un gaz ou d'un mélange de gaz (désignés ci-après par le terme général « gaz »).

Conformément à l'invention, le gaz utilisé pour la formation de la mousse adhésive peut être associé, de manière préférée, au composé

protéique polymérisable/réticulable et/ou à l'agent de polymérisation/réticulation, et/ou apporté indépendamment de l'un de ces constituants.

Le terme « associé » désigne le cas où le gaz est simplement
5 contenu dans le même récipient que la solution aqueuse contenant éventuellement l'agent de polymérisation/réticulation (phases liquide/gaz)

comme le cas où le gaz est mélangé à l'un des constituants qui est par exemple sous forme pulvérulente ou lyophilisée.

Le gaz peut aussi être apporté indépendamment seul ou associé à
10 un véhicule qui est non toxique, biocompatible et biodégradable et qui est mélangé avec la matrice adhésive et ses éléments constitutifs au moment de la préparation de la mousse adhésive.

Il peut s'agir d'un composé protéique tel que celui mis en œuvre pour la formation de la matrice adhésive. Toutefois, dans ce cas, la
15 quantité de composé protéique servant de véhicule est telle qu'il ne peut permettre la formation de la matrice adhésive à lui seul.

Le véhicule peut renforcer ou compléter l'activité de la mousse ou présenter une activité biologique. Il peut en particulier constituer
20 parallèlement un véhicule pour une (des) substance(s) biologiquement active(s) comme indiqué ci-après.

Dans ce cas, le mélange pour la formation de la matrice adhésive peut être préalablement réalisé (pour conduire au matériau de matrice adhésive) puis le gaz éventuellement associé à un véhicule tel que décrit
25 précédemment, est alors introduit dans la matrice adhésive déjà en cours de formation.

L'agent de polymérisation/réticulation et/ou le véhicule contenant le gaz se présente de préférence sous forme déshydratée, en particulier lyophilisée.

En variante, le véhicule peut être, de manière moins préférée, sous
30 forme liquide.

Selon un autre aspect de l'invention, d'autres composants n'interférant pas avec la formation de la mousse peuvent être incorporés.

La mousse adhésive peut ainsi permettre la délivrance de substances biologiquement actives sur le site cible où elle est appliquée.

Une grande variété de substances biologiquement actives peut ainsi être mélangée au véhicule. Des exemples de telles substances
5 incluent, mais de façon non limitative : drogues, vitamines, facteurs de croissance, hormones, dérivés stéroïdes, antibiotiques, vaccins, anti-viraux, antifongiques, anti-parasites, anti-tumoraux, anti-cancéreux, toxines, enzymes, inhibiteur d'enzymes, protéines, peptides, composés minéraux (ex. dérivés du zinc, du cuivre, du sélénium),
10 neurotransmetteurs, lipoprotéines, glycoprotéines, immuno-modulateurs, immunoglobulines et fragments de ceux-ci, agents de contraste, dérivés d'acides gras, polysaccharides, acides nucléiques (ex. fragments d'ADN, d'ARN) et polynucléotides.

Parmi les facteurs de croissance, les facteurs suivants ou leurs
15 gènes correspondants sont particulièrement préférés : facteurs de type EGF (Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), TGF- β Transforming Growth Factor - β) incluant les BMP (Bone Morphogenetic Protein), IGF (Insulin Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou analogues et
20 dérivés de ces facteurs.

Ces substances biologiquement actives peuvent être mélangées en solution avec le véhicule, puis éventuellement déshydratées par tout moyen connu de l'homme de l'art.

Il est possible également de reprendre un véhicule déshydraté dans
25 un volume minimal de solution contenant la(les) substance(s) biologiquement active(s) ou d'ajouter une solution concentrée de cette(ces) substance(s) biologiquement active(s) à un véhicule déshydraté.

Enfin, de façon moins préférée, il est possible également de réaliser
30 une solution aqueuse du véhicule mélangé à une(des) substance(s) biologiquement active(s) avant d'être mélangé au gaz.

Tout procédé connu de l'homme de l'art peut être employé pour réaliser la mousse, consistant simplement à mélanger différents produits et un gaz de manière homogène. Le mélange est réalisé extemporanément avant utilisation pour obtenir une mousse adhésive
5 fluide prête à l'emploi, injectable.

~~A cet effet, on peut utiliser les kits qui font l'objet de la présente invention.~~

Les constituants nécessaires à la formation de la mousse sont de préférence contenus dans des seringues, la mousse étant obtenue par
10 transfert en va-et-vient du contenu d'une seringue dans l'autre jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

La mousse recueillie dans une seringue unique peut ensuite être appliquée au site désiré.

Le composé protéique sous forme déshydratée peut être introduit
15 dans une seringue puis stérilisé.

Pour ce faire, la seringue est introduite dans une double enveloppe étanche à l'air et à la vapeur, puis irradiée par des rayons gamma par exemple, à une dose stérilisante de 5 à 35 kGy.

D'autre part, la solution aqueuse stérile d'agent de
20 polymérisation/réticulation est préparée dans une autre seringue, notamment par dissolution dudit agent sous forme sèche avec de l'eau distillée, contenus dans deux flacons stériles séparés.

La seringue contenant la solution d'agent de polymérisation/réticulation est chauffée à une température de 20 à 60°C,
25 de préférence 45 à 50°C, puis connectée à la seringue de composé protéique.

Les seringues sont fixées à un dispositif de maintien équipé de
~~moyens de mélange conçus pour pouvoir mélanger extemporanément leur~~
contenu de manière homogène.

30 Après injection de la solution aqueuse d'agent de polymérisation/réticulation dans la seringue de collagène, une dizaine de va-et-vient successifs sont nécessaires et peuvent être réalisés pour

obtenir directement une mousse protéique, fluide, adhésive, biocompatible, biodégradable et homogène.

Selon une variante particulièrement préférée de l'invention, l'agent de réticulation sous forme sèche peut être mélangé avec le composé
5 protéique en poudre sèche dans la même seringue. L'état déshydraté ~~empêche les deux produits de réagir l'un sur l'autre dans les conditions~~
normales de stockage à l'abri de l'humidité et à température ambiante. La seringue contenant les deux produits secs peut être ensuite stérilisée, notamment par irradiation gamma à une dose stérilisante comprise entre 5
10 et 30 kilograys.

La solution aqueuse nécessaire à la préparation de la mousse adhésive est dans ce cas tout simplement de l'eau distillée stérile contenue dans un flacon stérile dont le contenu est aspiré dans une seringue stérile par l'utilisateur. L'eau peut être fournie directement en
15 seringue stérile.

Dans tous les cas, il est nécessaire de réchauffer préalablement l'eau ou la solution aqueuse à la température optimale qui peut varier selon les formules entre 20 et 60°C, de préférence 45 à 50°C. Ceci peut être fait par tous les moyens connus soit sur un flacon, soit sur la
20 seringue ; directement dans un bain-marie, une étuve, ou un réchauffeur spécialement étudié pour ce produit dont le principe de fonctionnement peut reposer sur les micro-ondes, une résistance électrique, la lumière infra-rouge, etc ..., accompagné d'un système de thermostats pour garantir une régulation et une sécurité thermiques convenables.

25 La quantité de gaz nécessaire est présente également dans l'une des seringues ou partagée dans chacune d'elles de sorte que le gaz est introduit au moment de la formation du matériau de matrice adhésive par ~~mélange des constituants.~~

En variante, la quantité de gaz nécessaire éventuellement associée
30 à un véhicule comme décrit ci-dessus, peut provenir d'une autre seringue, auquel cas il est introduit dans le matériau de matrice adhésive en cours

de formation par polymérisation/réticulation, après mélange des constituants de base.

Lorsqu'il est mélangé à un véhicule, éventuellement combiné à une(des) substance(s) biologiquement active(s), le gaz représente de
5 préférence au minimum 50 % du volume total de la préparation, et de façon plus préférée, 90 % du volume total.

Le mélange se fait de préférence en incorporant un volume de gaz représentant 25 à 90% du volume total de la mousse, de préférence de 40 à 75%.

10 Ce mélange se fait par ailleurs à une température favorisant l'incorporation du gaz dans la colle biologique. La température finale obtenue est de préférence physiologique, de façon plus préférée comprise entre 18°C et 41°C.

Le cas échéant, l'introduction de gaz se fait au tout début de la
15 réticulation, de préférence lorsque la viscosité du mélange est la plus faible.

Le procédé de préparation est particulièrement avantageux par rapport aux procédés antérieurs pour les raisons suivantes :

Il ne nécessite que :

- 20 - un minimum d'opérations manuelles élémentaires,
- des équipements de répartition, de filtration très courants dans les laboratoires de fabrication et de répartition pharmaceutiques,

Il est particulièrement simple et assure en final une stérilité facile à garantir car elle ne repose que sur des méthodes parfaitement validées,
25 en usage depuis longtemps.

La matrice adhésive selon l'invention est caractérisée par la présence de pores d'un diamètre compris généralement entre 50 et 200 microns.

Cette porosité confère au produit des propriétés remarquables vis-
30 à-vis des plaquettes sanguines qui peuvent y adhérer plus rapidement grâce à la grande surface de contact extérieure. Il se forme un agrégat de plaquettes activées qui sécrètent les facteurs de coagulation nécessaires

à l'hémostase. La matrice adhésive acquiert ainsi grâce à cette porosité des propriétés hémostatiques qui permettent d'arrêter des saignements par l'action conjuguée de l'étanchement mécanique de la plaie et de l'activation plaquettaire au contact du sang.

5 Cette porosité confère à la matrice adhésive une grande élasticité
- qui en fait un produit de choix pour étancher les plaies du poumon et
stopper les fuites d'air tout en réalisant l'hémostase locale après exérèse
d'une tumeur.

10 La porosité du matériau adhésif facilite sa colonisation cellulaire, sa
biodégradation et sa transformation en tissu cicatriciel tout en évitant la
formation d'adhérences postopératoires avec les organes adjacents à la
plaie.

15 Sa fluidité initiale permet son injection à l'aide de seringues et son
utilisation par laparoscopie à l'aide de canules et cathéters adaptés. Elle
peut être étalée facilement à l'aide d'une spatule ou d'un pinceau par
badigeonnage en chirurgie ouverte comme en laparoscopie.

20 Cet adhésif tissulaire poreux est donc particulièrement indiqué pour
réaliser l'hémostase des plaies chirurgicales ou traumatiques, les protéger
et en faciliter la cicatrisation en évitant la formation d'adhérences
postopératoires. Il peut bien sûr être utilisé aussi pour toutes opérations
de comblement, de collage de biomatériaux et en association avec des
médicaments pour une application locale.

25 L'invention a donc également pour objet les procédés de
traitements chirurgicaux ou médicaux comprenant la mise en place, en un
site approprié de l'organisme, par une voie d'abord convenable, d'une
quantité de mousse selon l'invention, efficace pour adhérer sur le site et
provoquer l'effet recherché.

Exemple 1 :

Réalisation d'une mousse adhésive préparée à partir de collagène déshydraté et d'amidon oxydé en solution

5

Préparation de l'amidon oxydé :

Une solution d'amidon soluble est préparée, à la concentration de 20 %, à la température de 75 °C, jusqu'à obtenir une solution parfaitement homogène, puis est dilué au 1/2. Elle est ensuite pré-filtrée et filtrée sur une

10

membrane de porosité 0,22 µm. Le pH de l'amidon est ajusté, alors, à pH 3,0-3,2 et la concentration de l'amidon à 6 %. On ajoute, ensuite, à la solution d'amidon oxydé du métaperiodate de sodium, à la concentration finale de 0,36 M, à température ambiante. Après 2 heures de traitement, la solution est

15

dialysée avec une membrane de seuil de coupure allant de 5 à 10 kDa, contre de l'eau déminéralisée ultra-filtrée. La dialyse est poursuivie jusqu'à l'élimination totale des produits dialysables de la réaction d'oxydation et des réactifs ainsi que des dérivés iodés, formés pendant la réaction.

20

Ensuite, la solution d'amidon oxydé est ajustée, en concentration, à la valeur souhaitée, entre 0,2 à 0,6 %. Elle est pré-filtrée et filtrée stérilement sur membrane de porosité 0,22 µm.

25

Le produit est stable pendant au moins un an, à une température de +4 à +25 °C, à l'abri de l'air. Pour la réalisation de la mousse adhésive, la solution d'amidon oxydé à la concentration de 0,2-0,6 % est conditionnée en seringues de 5 ml, à raison de 2,5 ml par seringue.

Préparation du collagène :

On prépare une solution acide de collagène à une concentration de 2 % par addition progressive d'une poudre de collagène acide dans l'eau, à une température de 20-25 °C. Dès que la solution est parfaitement

30

homogène, le collagène est neutralisé par ajout de phosphate de sodium, à la concentration finale de 10 mM, pour atteindre un pH de 6,5-8. La

solution de collagène est ensuite laissée au repos pendant 1 nuit, à 20-25°C, puis le collagène précipité est récupéré par centrifugation. Il est dessalé et déshydraté par une série de lavages acétoniques : dans l'ordre, 1 bain acétone/eau, 90/10, m/m, 3 bains acétone/eau, 80/20, m/m et 3
5 bains acétone 100 %.

~~Le collagène est ensuite réparti dans un volume de 2,5 ml dans des~~
seringues de 5 ml, à raison de 80-400 mg de collagène sec par seringue.

Le collagène utilisé est de source connue de l'homme de l'art incluant les collagènes recombinants. De type I bovin, il peut être acido-soluble ou
10 solubilisé par digestion à la pepsine. D'origine de placenta humain, il peut être préparé par extraction à la pepsine, selon le procédé décrit dans le brevet EP-A-0,214,035.

Le collagène réparti en seringues est ensuite stérilisé par gamma-irradiation à la dose 5-35 KGy.

15 *Réalisation de la mousse adhésive*

On préchauffe une seringue d'amidon oxydé à la température de 45-50 °C, puis on la raccorde à la seringue de collagène en utilisant un connecteur. On mélange, ensuite, le contenu des deux seringues en transférant, d'abord, le contenu de la seringue d'amidon oxydé dans la
20 seringue de collagène, puis, en chassant alternativement totalement le contenu de l'une dans l'autre, 10 à 20 fois jusqu'à obtenir une mousse adhésive complètement homogène.

Exemple 2 :

Réalisation d'une mousse adhésive préparée à partir d'amidon oxydé en
25 solution et d'un mélange déshydraté de collagène et de NSAID (anti-inflammatoires non stéroïdiens)

~~On reprend l'exemple 1 en mélangeant au collagène neutralisé et déshydraté par l'acétone des NSAID comme l'ibuprofène, le naproxène, la phénylbutazone en poudre, puis on conditionne cette nouvelle formulation~~

dans des seringues qui sont ensuite stérilisés par gamma-irradiation à la dose de 5-35 Kgy.

Suivant une autre variante de cet exemple, on ajoute au collagène lyophilisé, gamma-irradié 100-200 µl de NSAID, décrits ci-dessus, en solution.

La mousse adhésive est réalisée à partir de l'amidon oxydé et de ces nouvelles formulations du collagène comme décrit dans l'exemple 1.

La composition de cette mousse adhésive renferme une quantité pharmacologiquement active de NSAID, connue de l'homme de l'art, suivant les applications pour lesquelles une réaction inflammatoire trop importante doit être atténuée.

Exemple 3 :

Réalisation d'une mousse adhésive préparée à partir d'amidon oxydé en solution et d'un mélange déshydraté de collagène et d'antibiotiques

On reprend l'exemple 1 en mélangeant au collagène neutralisé et déshydraté par l'acétone des antibiotiques de la famille des macrolides, des cyclines, des céphalosporines et des lincosanides parmi lesquels la minocycline, l'amphotéricine, la clindamycine, la métacycline et l'érythromycine, en poudre.

Suivant une autre variante de cet exemple, on ajoute au collagène lyophilisé, gamma-irradié 100-200 µl d'antibiotiques décrits ci-dessus, en solution.

La mousse adhésive est réalisée à partir de l'amidon oxydé et de cette nouvelle formulation du collagène comme décrit dans l'exemple 1.

La composition de cette mousse adhésive renferme une quantité pharmacologiquement active d'antibiotiques, connue de l'homme de l'art, suivant les applications présentant des risques d'infection.

Exemple 4 :

Réalisation d'une mousse adhésive préparée à partir de collagène et d'amidon oxydé déshydratés

Préparation de l'amidon oxydé déshydraté :

L'amidon oxydé est préparé comme décrit dans l'exemple 1, à la concentration de 1-3%. Il est réparti dans des seringues de 5 ml, à raison
 5 de 0,5 ml par seringue, puis est lyophilisé.

~~Suivant une autre variante, l'amidon oxydé est neutralisé par addition de~~
 tampon phosphate pour obtenir une concentration finale de 10 mM et un
 pH de 6-8. Il est réparti dans des seringues de 5 ml, à raison de 0,5 ml par
 seringue, puis est lyophilisé.

10 Dans les seringues d'amidon oxydé lyophilisé, on ajoute 80 à 400 mg de
 collagène, préparé comme décrit dans l'exemple 1, dans un volume total
 de 2,5 ml. L'ensemble est, ensuite, stérilisé par gamma-irradiation à la
 dose 5-35 Kgy.

Réalisation de la mousse adhésive

15 On préchauffe une seringue de 5 ml contenant 2,5 ml d'eau stérile
 injectable à une température de 45-55 °C, puis on la raccorde à la
 seringue de collagène en utilisant un connecteur. On mélange, ensuite, le
 contenu des deux seringues en transférant, d'abord, le contenu de la
 seringue d'eau dans la seringue de collagène, puis, en chassant
 20 alternativement totalement le contenu de l'une dans l'autre, 10 à 20 fois
 jusqu'à obtenir une mousse adhésive complètement homogène.

Exemple 5 :

Réalisation d'une mousse adhésive préparée à partir d'albumine
 déshydratée et d'amidon oxydé en solution

25 *Préparation de l'amidon oxydé*

L'amidon oxydé en solution est préparé comme indiqué par l'exemple 1
 avec comme seule différence majeure, la concentration de la solution
 utilisée est de 2-5 %. On remplit, ensuite, des seringues de 5 ml avec 2,5
 ml de solution d'amidon oxydé.

30 *Préparation de l'albumine*

L'albumine utilisée est de source connue de l'homme de l'art. Elle peut être d'origine bovine ou humaine, issue ou non de recombinaison génétique.

L'albumine est conditionnée dans des seringues de 5 ml à raison de 0,4-
 5 1,25 g de poudre par seringue collagène dans un volume total de 2,5 ml et
~~est, ensuite, stérilisée par irradiation bêta (à l'aide d'un faisceau~~
 d'électrons accélérés) à la dose 5-35 KGy.

Réalisation de la mousse adhésive

On préchauffe une seringue d'amidon oxydé à la température de 45-50
 10 °C, puis on la raccorde à la seringue d'albumine en utilisant un
 connecteur. On mélange, ensuite, le contenu des deux seringues en
 transférant, d'abord, le contenu de la seringue d'amidon oxydé dans la
 seringue d'albumine, puis, en chassant alternativement totalement le
 contenu de l'une dans l'autre, 10 à 20 fois jusqu'à obtenir une mousse
 15 adhésive complètement homogène.

Exemple 6 :

Réalisation d'une mousse adhésive préparée à partir d'albumine et
 d'amidon oxydé déshydratés

Préparation de l'amidon oxydé déshydraté :

20 L'amidon oxydé est préparé comme décrit dans l'exemple 1, à la
 concentration de 2-5 %. Il est réparti dans des seringues de 5 ml, à raison
 de 2,5 ml par seringue, puis est lyophilisé.

Suivant une autre variante, l'amidon oxydé est neutralisé par addition de
 tampon phosphate pour obtenir une concentration finale de 10 mM et un
 25 pH de 6-8. Il est réparti dans des seringues de 5 ml, à raison de 2,5 ml par
 seringue, puis est lyophilisé.

~~Dans les seringues d'amidon oxydé lyophilisé, on ajoute 0,4 1,25 g~~
 d'albumine dans un volume total de 2,5 ml. L'ensemble est stérilisé par
 gamma-irradiation à la dose de 5-30 Kgy.

Réalisation de la mousse adhésive

On préchauffe une seringue de 5 ml contenant 2,5 ml d'eau stérile injectable à une température de 45-50 °C, puis on la raccorde à la seringue d'albumine en utilisant un connecteur. On mélange, ensuite, le
 5 contenu des deux seringues en transférant, d'abord, le contenu de la seringue d'eau dans la seringue d'albumine, puis, en chassant alternativement totalement le contenu de l'une dans l'autre, 10 à 20 fois jusqu'à obtenir une mousse adhésive complètement homogène.

10 **Exemple 7 :**

Réalisation d'une mousse adhésive constituée de collagène oxydé neutralisé et de collagène chauffé

Préparation du collagène oxydé

On reprend 25 g de collagène acide sec dans 830 ml d'eau déminéralisée
 15 apyrogène. On mélange à la solution de collagène 92 ml d'acide periodique 88 mM, repris dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,12 N.

Après 2-4 heures de traitement, le collagène oxydé est précipité en versant 937 ml de chlorure de sodium 82 g/l. Puis, le mélange est
 20 homogénéisé sous faible agitation pendant 60 minutes. Le précipité est ensuite récupéré sur toile de nylon de porosité 100 µm.

Ce précipité est lavé 1 fois dans 5,12 volumes, puis 3 fois dans 6,15 volumes d'une solution de chlorure de sodium, qui permet d'atteindre la concentration finale en chlorure de sodium de 41 g/l dans la solution de
 25 précipité collagénique.

Le précipité de collagène est débarrassé du sel et partiellement déshydraté, en utilisant 10 à 15 volumes d'acétone, 1 fois à une concentration de 90 %, puis 3 fois à une concentration de 80 %. Il est ensuite repris dans de l'eau déminéralisée apyrogène à une concentration
 30 de 2,5 %, jusqu'à obtenir une solution homogène, qui est ensuite neutralisée, à un pH de 6,5-8, avec une solution de tampon phosphate

concentrée pour obtenir une concentration finale en phosphate de 20 mM.
Le gel est ensuite lyophilisé.

Préparation de collagène chauffé

On prépare une solution acide de collagène à une concentration de 4 à 16
5 % par addition progressive d'une poudre de collagène acide dans l'eau, à

~~une température de 42 °C. Très rapidement, après 2 à 5 minutes~~
d'agitation, dès que la fluidité le permet, la solution est neutralisée avec
une solution molaire de soude, à un pH variant de 6,5 à 7,5.

Le collagène utilisé est de source connue de l'homme de l'art incluant les
10 collagènes recombinants. De type I bovin, il peut être acido-soluble ou
solubilisé par digestion à la pepsine. D'origine de placenta humain, il peut
être préparé par extraction à la pepsine, selon le procédé décrit dans le
brevet EP-A-0,214,035.

Le collagène chauffé est ensuite déshydraté par lyophilisation.

15 *Réalisation du mélange collagène oxydé / collagène chauffé*

On répartit, dans des seringues de 5ml, 0,2-1 g de poudre de collagène
avec un rapport collagène oxydé / collagène chauffé allant de 0,5 à 2,
dans un volume total de 2,5 ml.

Les seringues conditionnées sont ensuite stérilisées par gamma-
20 irradiation à la dose de 5-35 KGy.

Réalisation de la mousse adhésive

On préchauffe une seringue de 5 ml contenant 2,5 ml d'eau stérile
injectable à une température de 40-50 °C, puis on la raccorde à la
seringue de collagène en utilisant un connecteur. On mélange, ensuite, le
25 contenu des deux seringues en transférant, d'abord, le contenu de la
seringue d'eau dans la seringue de collagène, puis, en chassant
alternativement totalement le contenu de l'une dans l'autre, 10 à 20 fois
jusqu'à obtenir une mousse adhésive complètement homogène.

Exemple 8 :

Réalisation d'une mousse adhésive constituée de collagène oxydé neutralisé et de collagène chauffé et mélangé au FGF

5 On reprend l'exemple précédent avec les modifications ci-dessous.

A la seringue de collagènes, on ajoute 100 à 250 µl d'une solution de FGF humain recombinant. Puis, on mélange les collagènes à de l'eau stérile à 40-50°C, comme décrit précédemment jusqu'à obtenir une mousse homogène.

10 Selon une autre variante, on attend un temps d'adsorption du FGF sur les collagènes, de 5 à 120 minutes, avant de procéder au mélange de la préparation de collagènes / FGF à l'eau.

Une autre variante de cet exemple consiste à lyophiliser le FGF avec le collagène oxydé, suivant le procédé ci-dessous. On mélange, au précipité
15 de collagène oxydé, une solution de FGF. On procède ensuite à la lyophilisation de ce mélange. On ajoute cette nouvelle formulation de collagène oxydé au collagène chauffé comme décrit dans l'exemple précédent. Le contenu de la seringue de collagène oxydé et de collagène chauffé est ensuite repris par 2,5 ml d'eau tiède stérile à 40-50 °C et
20 homogénéisé comme décrit dans l'exemple précédent.

Cette mousse adhésive est particulièrement employée pour le comblement de lésions nerveuses, le FGF étant un facteur facilitant la régénération des nerfs.

Dans cet exemple, on peut remplacer le FGF par son gène, d'autres
25 facteurs de croissance, leurs gènes ou leurs mélanges, possédant des activités équivalentes au FGF.

Dans cet exemple, on peut remplacer le FGF par d'autres facteurs de croissance, leurs gènes ou leurs mélanges pour d'autres indications comme la cicatrisation cutanée et osseuse (FGF, PGDF, TGF beta, BMP, VEGF), le traitement de cancers (interleukine, interférons) ...
30

Exemple 9

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive associant l'albumine et des polyéthylènes glycols portant des groupes électrophiles activés réactifs vis-à-vis des amines

5 *Préparation de l'albumine*

~~L'albumine utilisée est de source connue de l'homme de l'art.~~ Elle peut être d'origine bovine ou humaine, issue ou non de recombinaison génétique.

10 Une partie d'albumine en poudre est mélangée à 0,05-1 partie en masse de PEG électrophiles activés et déshydratés. Parmi les PEG électrophiles activés, on peut utiliser indifféremment, seul ou mélangés en toutes proportions, le SPA-PEG (succinimidyl propionate PEG), le SCM-PEG (Succinimidyl ester of carboxymethylated PEG) et le BTC-PEG (Benzotriazole carbonate of PEG) de poids moléculaire supérieur à 1000
15 Daltons, dérivés de PEG, produits commercialisés par Shearwater Polymers. On peut également utiliser le PEG-SS2 (Disuccinimidyl succinate PEG), synthétisé comme décrit dans la demande de brevet PCT WO 96/03159 (Minnesota Mining and Manufacturing Company). Le
20 mélange albumine / PEG électrophiles activés est conditionné dans des seringues de 5 ml à raison de 0,5-1,8 g de poudre par seringue dans un volume total de 2,5 ml et est, ensuite, stérilisée par gamma-irradiation à la dose 5-35 KGy.

Réalisation de la mousse adhésive

25 On mélange l'albumine et les PEG activés avec de l'eau stérile à 40-55 °C, en transférant la totalité du contenu de la seringue d'eau dans celle d'albumine, puis en chassant entièrement le contenu de l'une des deux seringues dans l'autre, 5 à 10 fois jusqu'à obtenir un gel complètement homogène de 5 ml.

30 A partir du moment où l'on prépare la colle associant l'albumine et les dérivés électrophiles de PEG activé, la mousse doit être réalisée et

utilisée avant que la colle soit entièrement polymérisée pour qu'elle puisse adhérer aux tissus.

Exemple 10

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive associant l'albumine
5 et des PEG activés réactifs vis-à-vis des sulfhydryles

On reprend l'exemple précédent en remplaçant les PEG activés électrophiles par des PEG activés réactifs vis-à-vis des sulfhydryles.

Parmi les PEG activés réactifs vis-à-vis des sulfhydryles, on peut utiliser indifféremment, seul ou mélangés en toutes proportions, le VS-PEG (vinyl sulfone PEG), le MAL-PEG (Maleimide PEG) et le OPSS-PEG (orthopyridyl-disulfide PEG) de poids moléculaire supérieur à 1000 Da,
10 dérivés de PEG, produits commercialisés par Shearwater Polymers.

La mousse adhésive est ensuite réalisée comme décrit dans l'exemple précédent.

15

Exemple 11

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive associant le collagène et des polyéthylènes glycols portant des groupes électrophiles activés réactifs vis-à-vis des amines

20 On reprend l'exemple 9 en remplaçant l'albumine par le collagène neutralisé, préparé comme décrit dans l'exemple 1. Une partie de collagène neutralisé et lyophilisé est mêlée à 0,05-1 partie de PEG électrophiles activés et déshydratés, en masse. Ce mélange collagène neutralisé / PEG électrophiles activés est conditionné dans des seringues
25 de 5 ml à raison de 0,2-0,8 g de poudre par seringue collagène dans un volume total de 2,5 ml et est, ensuite, stérilisée par gamma-irradiation à la dose 25-35 KGy.

La mousse adhésive est ensuite réalisée comme décrit dans l'exemple 9.

Exemple 12

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive associant le collagène et des PEG activés réactifs vis-à-vis des sulfhydryles

On reprend l'exemple 9 en remplaçant l'albumine par le collagène
 5 neutralisé, préparé comme décrit dans l'exemple 1. Une partie de
~~collagène neutralisé et séché est mêlée à 0,05-1 partie de PEG~~ activés
 réactifs vis-à-vis des sulfhydryles et déshydraté, en masse. Ce mélange
 collagène neutralisé / PEG activés réactifs vis-à-vis des sulfhydryles est
 conditionné dans des seringues de 5 ml à raison de 0,2-0,8 g de poudre
 10 par seringue collagène dans un volume total de 2,5 ml et est, ensuite,
 stérilisée par gamma-irradiation à la dose 25-35 KGy.

La mousse adhésive est ensuite réalisée comme décrit dans
 l'exemple 9.

15 Exemple 13 :

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive associant du collagène oxydé et un tampon phosphate neutre à alcalin.

Préparation du collagène oxydé

20 On reprend 25 g de collagène sec dans 830 ml d'eau déminéralisée
 apyrogène. On mélange à la solution de collagène 92 ml d'acide
 periodique 88 mM, repris dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique
 0,12 N.

Après 2-4 heures de traitement, le collagène oxydé est précipité en
 25 versant, sans agiter, 937 ml de chlorure de sodium 82 g/l. Puis, le
 mélange est homogénéisé sous faible agitation pendant 60 minutes. Le
 précipité est ensuite récupéré sur toile de nylon de porosité 100 µm.

~~Ce précipité est lavé 1 fois dans 5,12 volumes, puis 3 fois dans 6,15~~
 volumes d'une solution de chlorure de sodium, qui permet d'atteindre la
 30 concentration finale en chlorure de sodium de 41 g/l dans la solution de
 précipité collagénique.

Le précipité de collagène est débarrassé du sel et partiellement déshydraté, en utilisant 10 à 15 volumes d'acétone, 1 fois à une concentration de 90 %, puis 3 fois à une concentration de 80 %. Il est ensuite repris dans de l'eau déminéralisée apyrogène à une concentration
5 de 3-6 %. Deux ml de cette solution de collagène oxydé sont répartis dans ~~des seringues de 5 ml, puis lyophilisés. Après ce traitement, les seringues~~
sont conditionnées dans un double emballage, puis stérilisées par gamma-irradiation.

Préparation d'un tampon de pH neutre à alcalin

10 On prépare une solution aqueuse de tampon phosphate 10-20 mM, de pH 7,5-9 qu'on stérilise par filtration sur membrane de porosité 0,22 μ m. On remplit stérilement des seringues de 5 ml avec 2 ml du tampon ainsi préparé.

Une autre variante est de préparer une solution aqueuse de tampon
15 carbonate 10-20 mM, de pH 7,5-9, stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0,22 μ m. On remplit de la même manière des seringues de 5 ml avec 2 ml de tampon.

Une autre variante de stérilisation des tampons est de traiter les seringues remplies de tampon, conditionnées dans un double emballage, par
20 gamma-irradiation, à une dose comprise entre 25 et 35 Kgy.

Réalisation de la mousse adhésive

On connecte les deux seringues de collagène oxydé et de tampon – préparées comme décrit ci-dessus – par un simple raccord. Les deux produits sont homogénéisés, en commençant par faire passer le tampon
25 dans la seringue contenant le collagène oxydé lyophilisé, puis en transférant le contenu d'une seringue à l'autre, en poussant tour à tour leurs pistons, 10 à 20 fois, jusqu'à obtenir une mousse homogène.

Exemple 14 :

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive associant du collagène oxydé et un tampon phosphate neutre à alcalin contenant du

5 VEGF

Préparation d'une solution de VEGF

On prépare une solution de pH neutre, contenant du VEGF à une concentration active dans le traitement de l'hyperplasie intinale de vaisseaux sanguins, l'hypertension et de l'athérosclérose, soit entre 1 et 10 50 nM.

Cette solution peut être préparée extemporanément à partir de VEGF, sous forme de poudre stérile et d'un tampon de reprise permettant d'obtenir la concentration finale souhaitée de VEGF.

15 Suivant les deux méthodes de préparation, le VEGF en solution est conditionné à raison de 0,5 ml dans des seringues de 5 ml.

Dans une autre variante, on prendra, à la place du VEGF, son gène qui sera formulé avec des vecteurs permettant son insertion dans le génome des cellules cibles, suivant des procédés connus de l'homme de l'art.

20 Cette formulation stérilisée, d'après les méthodes connues des spécialistes du domaine, est conditionnée dans des seringues de 5 ml, à raison de 0,5 ml par seringue.

Réalisation de la mousse adhésive collagène oxydé' - VEGF

La mousse adhésive est préparée comme indiqué dans l'exemple 13.

25 Cette mousse est ensuite mélangée à la solution de VEGF ou de son gène, jusqu'à obtenir une mousse homogène, avec le VEGF ou son gène uniformément réparti dans la mousse.

Exemple 15 :

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive préparée à partir des constituants de la colle de fibrine et du collagène natif.

5 *Colles de fibrine*

Pour cet exemple, on peut reprendre tous les ingrédients des colles de fibrines du commerce. On peut préparer également indépendamment un concentré de protéines coagulables – essentiellement le fibrinogène et la fibronectine – contenant également le facteur XIII de la coagulation -, à partir de plasma humain. Le concentré de protéines coagulables peut être remplacé par du fibrinogène humain, pur à plus de 99 %, recombinant ou purifié à partir de sources conventionnelles comme le plasma. La thrombine, l'agent de réticulation, est conservée en solution ou déshydratée par tout moyen connu de l'Homme de l'art. Elle est de préférence d'origine humaine recombinante ou extraite à partir de sources humaines, connues de l'Homme de l'art. On utilise également du chlorure de calcium et une solution d'inhibiteurs de protéases comme l'aprotinine.

Préparation de collagène natif

Le collagène natif est précipité par des sels de phosphate à pH neutre comme indiqué par l'exemple 1. Il est, ensuite, mélangé au concentré liquide de protéines coagulables telles que ci-dessus et à un inhibiteur de protéases comme l'aprotinine. Puis, 2 ml du produit résultant est lyophilisé après dans des seringues de 5 ml. Typiquement, le lyophilisat contient 20-100 mg de collagène, 75-115 mg de protéines coagulables et, éventuellement, 10-50 U de facteur XIII (1 unité de facteur XIII correspond à l'activité contenue dans 1 ml de plasma frais normal). Cette préparation est stérilisée par tout moyen connu de l'Homme de l'art, de préférence par gamma-irradiation à la dose de 5-35 Kgy.

Une autre variante est de mélanger un précipité stérile de collagène natif avec un concentré stérile de protéines coagulables additionnées

d'aprotinine et de lyophiliser l'ensemble, dans des conditions stériles, pour obtenir un produit prêt à l'emploi.

Réalisation de la mousse fibrine / collagène natif

On reprend en solution de la thrombine stérile et lyophilisée, dans 2 ml de chlorure de calcium stérile, dont la concentration finale est de 10-40 mM.

Puis, cette solution est aussitôt transférée dans une seringue de 5 ml pour être mélangée rapidement avec la préparation de collagène natif, en connectant les deux seringues par un simple raccord. Les deux produits sont homogénéisés, en commençant par faire passer la solution de thrombine dans la seringue contenant le collagène natif, puis en transférant le contenu d'une seringue à l'autre, en poussant tout à tour leurs pistons, 10 à 20 fois, jusqu'à obtenir une mousse homogène.

Pour cette mousse, la quantité de thrombine est ajustée pour que le temps de formation de fibrine puisse être suffisamment long pour permettre la réalisation de la mousse, et son injection et son adhésivité sur les tissus cibles.

Exemple 16 :

Autre procédé de préparation d'une mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive préparée à partir des constituants de la colle de fibrine et du collagène natif.

Préparation de collagène natif

Dans une variante de l'exemple 15, on prépare un mélange de collagène neutralisé et de thrombine qu'on lyophilise ensuite. Le collagène est précipité et neutralisé comme décrit dans l'exemple 1. On réalise ensuite le mélange de la solution de collagène précipité à 1-3 % à la thrombine, pour avoir une concentration finale en thrombine de 2-10 U./ml ou de 250-1000 U./ml, puis on lyophilise 2 ml de ce mélange dans des seringues de 5 ml. Cette préparation est stérilisée par tout moyen connu de l'Homme de l'art, de préférence par gamma-irradiation à la dose de 5-35 Kgy.

Une autre variante est de mélanger un précipité stérile de collagène natif avec une solution stérile de thrombine et de lyophiliser l'ensemble, dans des conditions stériles, pour obtenir un produit prêt à l'emploi.

Réalisation de la mousse fibrine / collagène natif

- 5 On reprend en solution un concentré de protéines coagulables tel que décrit dans l'exemple 15 et de l'aprotinine, dans 2 ml de chlorure de calcium stérile, dont la concentration finale est de 10-40 mM. Puis, cette solution est aussitôt transférée dans une seringue de 5 ml pour être mélangée rapidement avec la préparation de collagène natif, en
- 10 connectant les deux seringues par un simple raccord. Les deux produits sont homogénéisés, en commençant par faire passer la solution de thrombine dans la seringue contenant le collagène natif, puis en transférant le contenu d'une seringue à l'autre, en poussant tour à tour les pistons, 10 à 20 fois, jusqu'à obtenir une mousse homogène.

15

Exemple 17 :

Mousse adhésive constituée d'une matrice adhésive préparée à partir des constituants de la colle de fibrine, de collagène natif et de facteurs neurotrophiques.

20

- On reprend indifféremment l'exemple 15 ou l'exemple 16 en ajoutant à la solution de collagène natif avant qu'elle soit lyophilisée des facteurs neurotrophiques comme la neurotrophine -3 (NT-3 ; concentration finale de 5-30 µg/µl), le brain-derived-NTF (BDNF ; concentration finale 2-15
- 25 µg/µl), le ciliary NTF (CNTF ; concentration finale : 1-10 µg/µl) ou le FGF. Cette formulation est utilisée pour la régénération de nerfs du système nerveux périphérique et central.

- Une autre variante de cet exemple est d'inclure à la place des facteurs neurotrophiques, d'autres facteurs de croissance permettant la
- 30 régénération nerveuse comme les facteurs sécrétés par les cellules olfactives engainantes ou par les tanocytes.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la préparation d'une mousse adhésive fluide
5 biocompatible, biorésorbable et non toxique, à usage chirurgical et/ou
thérapeutique, notamment pour la liaison de tissus biologiques entre eux

ou à un biomatériau implanté ou pour la protection de plaies, caractérisé
en ce qu'il comprend le fait de mélanger extemporanément, de manière
homogène un gaz ou un mélange de gaz biocompatibles et non toxiques
10 avec un matériau biocompatible, biorésorbable et non toxique obtenu par
mélange d'un composé protéique potentiellement adhésif, sous forme
pulvérulente, déshydratée et stérilisée, avec une solution aqueuse stérile.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le
15 composé protéique est un composé polymérisable/réticulable et en ce que
l'on amène, dans le mélange, un agent de polymérisation/réticulation.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'agent
de polymérisation/réticulation est initialement contenu dans la solution
20 aqueuse stérile.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'agent
de polymérisation/réticulation est contenu, à l'état solide sec, dans le
matériau protéique pulvérulent.

25 5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce
que les propriétés adhésives sont développées par un initiateur de
propriétés adhésives.

30 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit
agent initiateur comporte un agent de polymérisation/réticulation.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le composé protéique est à base de l'un au moins des composés suivants : collagènes, gélatines, albumine, élastine et fibrinogène.

5 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le composé protéique comprend l'un des collagènes suivants : collagène natif, collagène natif chimiquement modifié par méthylation, succinylation ou autres, collagène natif sans télopeptides, collagène constitué majoritairement de chaînes α dont le poids moléculaire est voisin de 100
10 kDa, non hydrolysées, dit collagène chauffé.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le composé protéique est stérilisé par irradiation gamma ou beta.

15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que, pour un composé protéique polymérisable/réticulable, l'agent de réticulation est choisi parmi des polymères réactifs naturels ou synthétiques de poids moléculaire supérieur à 1000.

20 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agent de polymérisation/réticulation est choisi parmi les polyaldéhydes macromoléculaires et les polymères hydrophiles, capables de réagir avec le composé protéique, notamment vis-à-vis de fonctions amines ou
25 sulfhydriles.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le polyaldéhyde macromoléculaire est choisi dans le groupe formé parmi les dérivés de polyéthylène glycol, les polyoxyéthylènes, les polyméthylènes glycol, les polytriméthylènes glycol, les polyvinylpyrrolidones.
30

13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composé protéique subit une coupure oxydative.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le
5 composé protéique est un collagène ayant subi une coupure oxydative par traitement par l'acide périodique ou l'un de ses sels.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'agent
de polymérisation/réticulation est formé d'un tampon à pH légèrement
10 alcalin pour permettre la réticulation du composé protéique à un pH sensiblement neutre.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en
ce que le gaz est introduit lors du mélange des constituants destinés à
15 former le matériau biocompatible, biorésorbable et non toxique.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en
ce que le gaz comporte ou est formé par le gaz présent dans le composé
protéique pulvérulent contenu dans un récipient.

20

18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en
ce que le gaz est choisi parmi les gaz suivants : air, dioxyde de carbone,
azote.

25

19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en
ce que la mousse comporte une ou plusieurs substances biologiquement
actives.

20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en
30 ce que l'on conditionne le composé protéique potentiellement adhésif sous forme pulvérulente, déshydratée et stérilisée dans un premier récipient, en ce que l'on conditionne la solution aqueuse stérile dans un second

réipient et en ce que l'on forme la mousse par transferts par va-et-vient du contenu de l'un des réipients dans l'autre jusqu'à l'obtention d'une mousse homogène.

- 5 21. Kit pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte un premier
-
- 10 réipient contenant le composé protéique potentiellement adhésif sous forme pulvérulente, déshydratée et stérilisée, un second réipient contenant la solution aqueuse stérile, des moyens pour mélanger le contenu des premier et second réipients, et des moyens pour mettre en œuvre un gaz dans ledit mélange et obtenir la mousse.

22. Kit selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdits réipients sont des seringues.

15

23. Kit selon la revendication 22, caractérisé en ce que lesdits moyens de communication permettent de faire passer plusieurs fois le mélange d'une seringue à l'autre pour assurer la formation de la mousse à partir du gaz compris dans la seringue contenant le composé protéique pulvérulent.

20

24. Kit selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que le réipient contenant le composé protéique est irradié pour sa stérilisation.

25

25. Kit selon l'une des revendications 21 à 24, caractérisé en ce qu'un agent de polymérisation/réticulation, sous forme sèche, est mélangé avec le composé protéique pulvérulent dans le premier réipient.
-